(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-118900
(P2008-118900A)
(43)公開日　平成20年5月29日(2008.5.29)

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063

審査請求 未請求　請求項の数 14　ＯＬ　（全 25 頁）

(21)出願番号　特願2006-305769 (P2006-305769)
(22)出願日　平成18年11月10日 (2006.11.10)

(71)出願人　000002897
大日本印刷株式会社
東京都新宿区市谷加賀町一丁目１番１号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100130443
弁理士　遠藤　真治
(72)発明者　服部　秀志
東京都新宿区市谷加賀町一丁目１番１号
大日本印刷株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞を用いた試験法および試験用キット

(57)【要約】
【課題】本発明は、初期の位置座標を決定可能な人為的に作製された細胞パターンをゲル状のマトリクス内で三次元培養した状態において生物学的試験を行う方法を提供する。
【解決手段】本発明は、実質的にゲルに包埋された細胞パターンにおいて細胞の増殖、運動及び分化からなる群から選択される少なくとも１つに関連する生物学的指標を試験することを特徴とする生物学的試験法、並びにそのためのキットに関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
実質的にゲルに包埋された細胞パターンにおいて細胞の増殖、運動及び分化からなる群から選択される少なくとも１つに関連する生物学的指標を試験することを特徴とする生物学的試験法。
【請求項２】
前記細胞パターンの全体がゲルに包埋されているか、前記細胞パターンの一部が露出し残部がゲルに包埋されているか、または前記細胞パターンの一部が固体基材と接触し残部がゲルに包埋されていることを特徴とする、請求項１記載の生物学的試験法。
【請求項３】
ゲルが細胞外マトリックスに含まれる少なくとも一種のタンパク質を含むゲル、擬似細胞外マトリックスを含むゲル、もしくは細胞シート、またはこれらの複合物であることを特徴とする、請求項１または２記載の生物学的試験法。
【請求項４】
ゲル中に更なる細胞が存在していることを特徴とする、請求項１～３のいずれか１項記載の生物学的試験法。
【請求項５】
実質的にゲルに包埋された細胞パターンが、細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具上で細胞培養を行い、培養後に培養表面にゲルを被覆することを含む方法により形成されたものであることを特徴とする、請求項１～４のいずれか１項記載の生物学的試験法。
【請求項６】
実質的にゲルに包埋された細胞パターンが、細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具上で細胞培養を行い、培養後に培養表面にゲルを被覆し、ゲル中に細胞パターンを転移させた後、培養器具を剥離することを含む方法により形成されたものであることを特徴とする、請求項５記載の生物学的試験法。
【請求項７】
実質的にゲルに包埋された細胞パターンが、細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具上で細胞培養を行い、培養後に培養表面にゲルを被覆し、ゲル中に細胞パターンを転移させた後、培養器具を剥離し、ゲル上の培養器具が剥離された面を更なるゲルで被覆することを含む方法により形成されたものであることを特徴とする、請求項６記載の生物学的試験法。
【請求項８】
培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む細胞接着阻害性の親水性膜に酸化処理および／または分解処理を施して細胞接着性とした膜で形成されており、細胞接着阻害性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されていることを特徴とする、請求項５～７のいずれか１項記載の生物学的試験法。
【請求項９】
培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とが、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されており、細胞接着性領域における前記有機化合物の密度が、細胞接着阻害性領域における前記有機化合物の密度と比較して低いことを特徴とする、請求項５～７のいずれか１項記載の生物学的試験法。
【請求項１０】
培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、これらの領域間の段差が１０ｎｍ以下であることを特徴とする、請求項５～９のいずれか１項記載の生物学的試験法。
【請求項１１】
細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具とゲルとを含むことを特徴とする

、生物学的試験用キット。
【請求項１２】
培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む細胞接着阻害性の親水性膜に酸化処理および／または分解処理を施して細胞接着性とした膜で形成されており、細胞接着阻害性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されていることを特徴とする、請求項１１記載の生物学的試験用キット。
【請求項１３】
培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とが、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されており、細胞接着性領域における前記有機化合物の密度が、細胞接着阻害性領域における前記有機化合物の密度と比較して低いことを特徴とする、請求項１１記載の生物学的試験用キット。
【請求項１４】
培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、これらの領域間の段差が１０ｎｍ以下であることを特徴とする、請求項１１～１３のいずれか１項記載の生物学的試験用キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、製薬分野、医療分野、食品分野、医学分野、薬学分野、生物学分野等で利用される、細胞を用いた生物学的試験法に関するものであり、旧来の二次元培養よりも有益な情報を得ることができるとされる三次元培養を用いた生物学的試験法に関するものであり、動物実験代替法としても価値のある技術に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
近年、製薬業界においては研究開発における投資効率の低下が問題になっており、高コストの動物実験の低減に役立つものとして、三次元培養法を用いた生物学的試験法が注目されている。三次元培養法による生物学的試験法は、特に新薬の体内における吸収・分布・代謝・排泄・毒性を予測可能にする基礎データを得ることに役立つことが期待されている。この技術は、製薬業界のみならず、医療における治療や診断、食品の安全性試験等にも波及するものである。また、学術研究分野においても旧来の二次元培養法を用いた研究から、細胞イメージング技術と三次元培養法を組み合わせた研究への展開が急速に進んでいる。既に、細胞イメージング技術と三次元培養法を組み合わせたスクリーニング技術が実用化され始めている。
【０００３】
従来の三次元培養法について説明する。もっとも単純な三次元培養法は、適当な容器の中でコラーゲンやアガロースゲル等のゲルマトリクスの中に分散した細胞を培養する方法である。また、培養容器の底にゲル層を形成し、その上に細胞を播いて培養する方法も、細胞がゲルの中に遊走あるいは浸潤する場合は三次元培養法とみなされるようである。非特許文献１には、培養容器の底にゲル層を形成し、その上に細胞を播いて培養し、所定時間後に培地を除いてゲル前駆体を細胞層の上に加え、それをゲル化させた後さらに培養する方法、いわゆるサンドイッチ培養法が記載されている。また、非特許文献２には通常の二次元培養細胞の上にゲル層を形成して試験する方法が記載されている。非特許文献３には、予めビーズ表面で細胞を培養しておき、それをゲルマトリクスに包埋して試験する方法が記載されている。また、非特許文献４には細胞の球状集合体（スフェロイド）をゲルマトリクスに包埋して試験する方法が記載されている。これらの三次元培養法においては、複数種の細胞を培養すること、すなわち共培養に関心が集まっている。なぜなら、単一種の細胞を培養する場合よりも、より生体内に近い細胞挙動を期待できるからである。
【０００４】

しかし、これらの方法では、単細胞や細胞集合体の初期の位置座標が特定できず、細胞集合体の大きさの分布を制御することも難しいために、ロボティクスと生細胞解析技術を組み合わせた先端的な生物学的試験システムに適応するには制限があった。非特許文献４に記載された方法であればフォーマット化されたウェルプレートの各ウェルに一個のスフェロイドが形成されるので、基本的に上記の問題は解消されるが、各ウェルで複数のスフェロイドを位置座標を決めて培養することができないために、各ウェルで複数データを取得し統計的にデータを解析することはできない。さらに、ゲルに包埋した状態でスフェロイドを顕微鏡観察するために、ウェルプレートの各ウェルで一個ずつ作製したスフェロイドを一度回収し、それをゲル化前の溶液に分散してキャストするという方法をとらざるを得なかった。さらに、非特許文献４に記載の方法はスフェロイドに限定されるため、細胞集合体の形状には制限がある。

【０００５】

一方、近年、半導体技術や印刷技術等の微細加工技術とバイオテクノロジーを組み合わせた研究分野の発展が著しい。この研究は、新しい医療技術や効率的な創薬ツールを産出する可能性があり大いに期待されている。例えば、非特許文献５、特許文献１、特許文献２、特許文献３に記載されているように、感光性の高分子材料（フォトレジスト）等をリソグラフィーする技術を応用して培養器具を作製し二次元細胞パターンを得ることが報告された。また、特許文献４および特許文献５には、フォトレジストを除去する工程も組み合わせて二次元の共培養系を実現し、細胞機能の試験に利用する技術が記載されている。最近は、分子レベルの厚みのコーティングを応用した二次元細胞パターンの作製技術とその応用が報告されている。非特許文献６には人為的に接着形態を制御された一個の細胞を構成要素とする細胞パターンを用いて、細胞の運動を試験する技術が記載されている。また、非特許文献７には細胞集合体を構成要素とする人為的な細胞パターンや人為的な幾何学的起伏を有する器具の上に形成された細胞シートを用いて細胞の増殖活性等を試験する技術が記載されている。さらに、細胞パターンを用いる例ではないが、非特許文献８には、単層の培養細胞に対して代謝酵素と化学物質を複合させたマイクロゲルアレイを接触させて代謝酵素による代謝物の毒性を試験する方法が報告された。

【０００６】

これらの技術の中で、高分子レジストを用いる一般的な方法（非特許文献５、特許文献１、特許文献２、特許文献３）は、一般的に細胞の運動を妨げる程度のレジストの厚みを有するので、通常の二次元培養と異なる細胞運動の試験系になる場合が多かった。そのため、手間がかかるわりには人工的な試験系と判断されることが多く、薬理試験等の応用分野から関心を持たれなかった。一方、特許文献４、特許文献５、非特許文献６および非特許文献７では、上記のレジストの厚みの問題が解消している。しかしながら、人為的な単細胞パターンや細胞集合体パターンをマトリクス中で培養する生物学的試験法には言及していない。非特許文献８の技術はハイスループットな新しい薬理試験法として期待されるが、単細胞や細胞集合体の運動に関わる項目の試験法には適さない。

【０００７】

さらに、最近は微細加工技術と三次元培養を組み合わせた技術が報告されている。特許文献６には、人為的に作製された血管内皮細胞と肝細胞から成るスフェロイドパターンを作製する方法とその利用が開示されている。非特許文献９には、ゲル化前のマトリクスの中で細胞を人為的に三次元配列させ、その後マトリクスをゲル化する技術が記載されている。また、特許文献７には、細胞層と基底膜層から構成される複合体にパターン培養された細胞層を転写し、人工組織を作製する方法が記載されている。非特許文献１０には、ステンシルマスクを用いてコラーゲンゲル上で細胞をパターン培養し、ステンシルマスクを外した後に、コラーゲン溶液を細胞パターンの上にのせてゲル化させることによってパターニングされた細胞をサンドイッチ培養する方法が記載されている。さらに、非特許文献１１には、レーザーアブレーションにより高分子パターンを作製して血管内皮細胞をパターン培養し、次いで、その細胞パターンをゲルに転写し、次いで転写された細胞パターンの上にゲルを形成して三次元培養する技術が記載されている。

【０００８】
しかしながら、特許文献６には、人為的に作製された単細胞パターンや細胞集合体パターンをゲル状のマトリクスの中で三次元培養する生物学的試験法について記載されていない。非特許文献９には、ゲル中で人為的に作製した細胞パターンを培養する技術が記載されているが、人為的なパターンで作製された単細胞や細胞集合体のゲルマトリクス中における運動に関する生物学的指標を試験する方法については開示されていない。特許文献７、非特許文献１０および非特許文献１１には、人為的なパターンで作製された細胞集合体の三次元培養技術について記載されている。しかしながら、細胞集合体の運動や増殖に関わる項目についての生物学的試験を意図した発明ではなく、それに関する記載はほとんどない。さらに、特許文献７および非特許文献１１では、硬い培養器具から細胞を転写するのに２４時間程度を要している。このことは、細胞が硬い培養器具と強く相互作用していることを示唆しており、従来の三次元培養技術と比較して、人工的な要因を含む培養系と認識される可能性が高いという問題がある。さらに非特許文献１０の方法は、ステンシルマスクは必須要件なので細胞パターンのデザインの自由度に制約があるという問題がある。

【０００９】
【特許文献１】特開平３－７５７６号公報
【特許文献２】特開平５－１７６７５３号公報
【特許文献３】第２７７７３９２号特許公報
【特許文献４】米国第６１３３０３０号特許公報
【特許文献５】米国第６２２１６６３号特許公報
【特許文献６】ＷＯ２００３／０１０３０２号再公表特許
【特許文献７】特開２００５－３４２１１２号公報
【非特許文献１】The FASEB Journal, vol.10, 1471-1484 (1996)
【非特許文献２】Molecular Biology of the Cell, vol.13, 2474-2485 (2002)
【非特許文献３】Tissue Engineering, vol.11, no.1/2, 257-266 (2005)
【非特許文献４】The FASEB Journal, vol.15, 447-457 (2001)
【非特許文献５】Journal of Biomedical Materials Research, vol.32, 165-173 (1996)
【非特許文献６】Proceedings of the National Academy of Sciences, vol.102, no.4, 975-978 (2005)
【非特許文献７】Proceedings of the National Academy of Sciences, vol.102, no.33, 11594-11599 (2005)
【非特許文献８】Proceedings of the National Academy of Sciences, vol.102, no.4, 983-987 (2005)
【非特許文献９】Nature Methods, vol.3, no.5, 369-375 (2006)
【非特許文献１０】Journal of Biomedical Material Research, vol.52, 346-353 (2000)
【非特許文献１１】２０００年度研究助成業績報告集（ＩＳＳＮ　０９１６－３７１９）財団法人　循環器病研究振興財団

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
本発明は、上記の公知技術では未だ十分に達成されていない培養細胞を用いた生物学的試験法とその試験キットを提供する。すなわち、本発明は、初期の位置座標を決定可能な人為的に作製された単細胞または細胞集合体からなる細胞パターンをゲル状のマトリクス内で三次元培養した状態において、または弱く細胞と相互作用している培養器具とゲル状のマトリクスを用いて擬三次元培養した状態において、生物学的試験を行う方法、特に単細胞または細胞集合体の運動に関わる項目を試験する方法を提供する。また、この方法を実現するのに好適な試験用キットを提供する。
【００１１】

本明細書における、細胞集合体（細胞集団）について定義する。細胞集合体（細胞集団）とは、少なくとも試験における三次元培養の初期において、複数の細胞が何らかの細胞間接着を介して集まっている状態をいう。なお、試験の過程において、細胞間接着は変化することは言うまでもない。

【００１２】

本発明は、以下の発明を包含する。

（１）実質的にゲルに包埋された細胞パターンにおいて細胞の増殖、運動及び分化からなる群から選択される少なくとも１つに関連する生物学的指標を試験することを特徴とする生物学的試験法。

（２）前記細胞パターンの全体がゲルに包埋されているか、前記細胞パターンの一部が露出し残部がゲルに包埋されているか、または前記細胞パターンの一部が固体基材と接触し残部がゲルに包埋されていることを特徴とする、（１）記載の生物学的試験法。

（３）ゲルが細胞外マトリックスに含まれる少なくとも一種のタンパク質を含むゲル、擬似細胞外マトリックスを含むゲル、もしくは細胞シート、またはこれらの複合物であることを特徴とする、（１）または（２）記載の生物学的試験法。

（４）ゲル中に更なる細胞が存在していることを特徴とする、（１）～（３）のいずれかに記載の生物学的試験法。

【００１３】

（５）実質的にゲルに包埋された細胞パターンが、細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具上で細胞培養を行い、培養後に培養表面にゲルを被覆することを含む方法により形成されたものであることを特徴とする、（１）～（４）のいずれかに記載の生物学的試験法。

（６）実質的にゲルに包埋された細胞パターンが、細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具上で細胞培養を行い、培養後に培養表面にゲルを被覆し、ゲル中に細胞パターンを転移させた後、培養器具を剥離することを含む方法により形成されたものであることを特徴とする、（５）記載の生物学的試験法。

（７）実質的にゲルに包埋された細胞パターンが、細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具上で細胞培養を行い、培養後に培養表面にゲルを被覆し、ゲル中に細胞パターンを転移させた後、培養器具を剥離し、ゲル上の培養器具が剥離された面を更なるゲルで被覆することを含む方法により形成されたものであることを特徴とする、（６）記載の生物学的試験法。

（８）培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む細胞接着阻害性の親水性膜に酸化処理および／または分解処理を施して細胞接着性とした膜で形成されており、細胞接着阻害性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されていることを特徴とする、（５）～（７）のいずれかに記載の生物学的試験法。

（９）培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とが、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されており、細胞接着性領域における前記有機化合物の密度が、細胞接着阻害性領域における前記有機化合物の密度と比較して低いことを特徴とする、（５）～（７）のいずれかに記載の生物学的試験法。

（１０）培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、これらの領域間の段差が１０ｎｍ以下であることを特徴とする、（５）～（９）のいずれかに記載の生物学的試験法。

【００１４】

（１１）細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具とゲルとを含むことを特徴とする、生物学的試験用キット。

（１２）培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む細胞接着阻害性の親水性膜に酸化処理および／または分解処理を施して細胞接着性とした膜で形成されており、細胞接着阻害

性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されていることを特徴とする、（１１）に記載の生物学的試験用キット。
（１３）培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とが、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されており、細胞接着性領域における前記有機化合物の密度が、細胞接着阻害性領域における前記有機化合物の密度と比較して低いことを特徴とする、（１１）に記載の生物学的試験用キット。
（１４）培養器具の培養表面が、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備え、これらの領域間の段差が１０ｎｍ以下であることを特徴とする、（１１）～（１３）のいずれかに記載の生物学的試験用キット。

【発明の効果】
【００１５】
本発明により、位置座標を決定でき且つ従来よりも細胞数が揃った任意の大きさの細胞集合体を、ゲル状のマトリクスの中で、あるいはそれに準じた環境の下で培養することが可能となる。特に、従来よりも定量性に優れた血管新生試験、生体の血管発生や血管新生を模した血管リモデリング試験、個々の細胞や細胞集合体の遊走や浸潤を阻害する化合物の薬理試験、上皮－間質転移、特に細胞集合体の上皮－間質転移に関する試験、がん組織の転移に関する試験、モデル細胞を用いた人工マトリクスの性能試験等の高度な三次元培養を伴う生物学的試験が実現可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】
【００１６】
（細胞パターン）
本発明において細胞パターンとは、単細胞または細胞集合体が人為的に位置を決めて配置されたものを指す。細胞が人為的に位置決めされていることにより、生物学的試験の開始時点の細胞または細胞集合体の位置座標が特定でき、顕微鏡観察が容易となり、統計的にデータ解析を行うことができる。また、細胞パターンを任意のサイズにすることが可能なので、個々の細胞集合体を構成する細胞数の数を、そのばらつきを非常に小さくして揃えることができる。また配置される複数の細胞または細胞集合体の間の距離を任意に設定できるので、試験内容に応じた距離で配置された複数の細胞または細胞集合体の間の相互作用を観察することも容易となる。さらに、細胞パターンの位置座標が決められるので、市販のスポッターなどを利用して、図６のように細胞または細胞集合体である細胞パターン（１４）と試験したい物質（１５）との距離Ｌを任意に設定して、試験したい物質（１５）をゲル（１６）中に局所的に配置することも容易となる。細胞パターンとしては、例えば単細胞またはスフェロイド（細胞の球状集合体）が所定の座標上に配置されているものや、複数の単細胞またはスフェロイドが所定の間隔ごとに配置されているものや、細胞集合体がライン状、ツリー状（樹状）、網目状、格子状、円形、四角形などの所定の形状を描くように配置されているものなどが挙げられる。細胞集合体により形成される細胞パターンは一次元状であっても、二次元状であっても、三次元状であってもよい。一次元の細胞パターンとしては、例えば細胞が線状に連なった細胞集合体により形成される細胞パターンが挙げられる。二次元の細胞パターンとしては、例えば皮膚の表皮細胞により形成される平面状の細胞集合体により形成される細胞パターンが挙げられる。三次元の細胞パターンとしてはスフェロイドや、血管内皮細胞等により形成される管状細胞集合体により形成される細胞パターンが挙げられる。また、二次元細胞集合体を複数積層して三次元細胞パターンを構成することもできる。一次元状または二次元状の細胞パターンがゲル中で三次元方向に成長または変形して三次元状の細胞パターンとなることもある。
【００１７】
細胞パターンを構成する細胞は試験の目的に応じて適宜選択することができる。特に接着性を有する哺乳類の細胞が有用であるが、適当なリガンドや細胞が共存する系では、白血球などの浮遊系の細胞を用いることも可能である。細胞の起源となる哺乳類の種としては、マウス、ラット、サル、イヌ、ブタ、ヒト等が挙げられる。また、初代細胞に代表さ

れる正常な細胞であってもよいし、患者の悪性腫瘍から取り出された初代細胞や株化された細胞に代表される異常な（病的な）細胞であってもよいし、正常細胞の継代の過程で無限増殖能を獲得した株化細胞であってもよい。細胞は胚性幹細胞であってもよいし、マルチな分化能を有する幹細胞であってもよいし、さらに分化能が限定された前駆細胞であってもよいし、分化を終えた分化細胞であってもよい。臓器の由来は、特に限定されない。例えば、肝臓の実質細胞である肝細胞、クッパー細胞、血管内皮細胞や角膜内皮細胞などの内皮細胞、繊維芽細胞、骨芽細胞、砕骨細胞、歯根膜由来細胞、表皮角化細胞などの表皮細胞、気管上皮細胞、消化管上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、角膜上皮細胞、乳腺上皮細胞などの上皮細胞、ペリサイト、平滑筋細胞や心筋細胞などの筋細胞、腎細胞、膵ランゲルハンス島細胞、末梢神経細胞や視神経細胞などの神経細胞、軟骨細胞、骨細胞などが挙げられる。なお、細胞は単一種を培養してもよいし二種以上の細胞を共培養してもよい。

【００１８】

本発明の特徴を最大に発揮する試験系のひとつは、細胞－細胞間結合を有する２個以上の細胞からなる細胞集合体を細胞パターンの要素とし、その細胞－細胞間結合をできるだけ維持して三次元培養試験を実施したい場合である。

【００１９】

また、本発明の特徴を最大に発揮すると考えられる試験系のひとつは、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT;上皮間葉移行)などの癌転移に関わる細胞集合体の運動性や形態変化をin vitroの三次元培養系で試験する場合である。

【００２０】

また、本発明の特徴を最大に発揮すると考えられる試験系のひとつは、ゲル中において、細胞集合体と試験したい物質の距離や細胞集合体と相互作用をみたい別種の細胞の距離を設定して三次元培養試験を行う場合である。

【００２１】

（ゲル）

本発明で用いられるゲルは、そのなかに包埋された細胞パターンが増殖、運動、分化等の機能を発揮することができるものである限り特に限定されない。ゲルの具体例としては、人工ハイドロゲル、例えば、ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等の親水性高分子やPuraMatrix（商標）等の人工ペプチド等の合成物を用いたハイドロゲルがある。また、多糖類からなるゲル、例えば、ヒアルロン酸やその誘導体を用いたゲル、デキストランやその誘導体を用いたゲル等がある。また、タンパク質からなるゲル、例えば、各種タイプのコラーゲンを用いたゲル、ゼラチン、フィブリンゲル等がある。また特殊な細胞外マトリクス、例えばMatrigel（商標）に代表される基底膜等の生体部位特異的なタンパク質からなるゲルがある。さらに、これらの複合体からなるゲルも用いることができる。これらのゲルの中でも、生物由来の原料を要素とするゲルが望ましい。多くの生物学的試験事例が蓄積されているので、それらを参考にして本発明を応用した個々の試験法を開発できるからである。ゲル化のための架橋反応は、物理的なものであってもよいし化学的なものであってもよいし、その両方であってもよい。また、人工ペプチドからなるゲルも好ましい。全合成で製造可能なので、生物学的活性やゲル化能力などの品質を管理しやすく試験の再現性が向上することが期待されるからである。さらに、本発明では、生きたゲルといえる細胞シートも適用可能である。また必要に応じて、ゲル中には更なる細胞が存在していてもよく、また試験のための薬剤が含まれていてもよい。

【００２２】

（ゲル中への細胞パターンの包埋）

本発明において細胞パターンは実質的にゲルに包埋されていることを特徴とする。「実質的にゲルに包埋されている」とは、細胞パターンの増殖、運動、分化等の機能に影響がない程度に細胞パターンの一部が露出またはゲル以外の部分に接触していてもよいことを意味する。すなわち本発明の試験法は、細胞パターンの全体がゲルに包埋されている状態のほか、細胞パターンの機能に影響がない程度に細胞パターンの一部がゲル以外の液体培地中または空気中に露出しているか、あるいは固体基材と接触している状態においても行

うことができる。図１～５には本発明の試験系の典型例を図示する。図１には、ゲル層（１）中に大部分が包埋され、一部が周囲の培養液等に露出した状態の細胞パターン（２）からなる試験系の断面図を示す。図２には、２つのゲル層（１）（３）の間に配置され、全体がゲルに包埋された細胞パターン（２）からなる試験系の断面図を示す。図３には、固体基材（４）に一部が接触し、残部がゲル層（１）に包埋された細胞パターン（２）からなる試験系の断面図を示す。図４には、２つのゲル層（５）（７）の間に配置され、全体がゲルに包埋された細胞パターン（６）と、ゲル層（７）（９）の間に配置され、全体がゲルに包埋された細胞パターン（８）とが積層配置された試験系の断面図を示す。図５には、ゲル層（１０）中に大部分が包埋された細胞パターン（１１）と、ゲル層（１３）中に大部分が包埋された細胞パターン（１２）とが接触するように対向配置された試験系の断面図を示す。細胞パターンの全体がゲルにより包埋されている場合、細胞パターンを構成する細胞の三次元培養が可能である。また細胞パターンが、細胞の増殖、運動、分化等の機能に影響がない程度に細胞パターンの一部が露出またはゲル以外の部分に接触している場合であっても、実質的な三次元培養が可能である。ゲルの内部及び周囲には、細胞培養に適した培養液や、生物学的試験に適した緩衝液が存在してもよい。

【００２３】

細胞パターンのゲルへの包埋は例えば次のような手順で行うことができる。細胞パターンを形成可能な培養表面を有する培養器具の培養表面上に細胞を播種し、細胞培養を行い、培養表面上に細胞パターンを形成させ、次いで培養表面にゲル層を被覆することにより図３に示すように一部が固体基材（４）に接触し、残部がゲル層（１）に包埋された細胞パターン（２）が得られる。更に細胞パターン（２）をゲル層（１）に転移させた後、培養器具（固体基材）（４）を剥離すると、図１に示すように一部が露出し、残部がゲル層（１）に包埋された細胞パターン（２）が得られる。更にゲル層（１）の培養器具が剥離された側の面を、ゲル層（３）で被覆することにより図２に示すように２つのゲル層（１）（３）中に包埋された細胞パターン（２）が得られる。また同様の工程を用いることで図４および５の試験系を作成することができる。２つ以上のゲル層を用いる場合、ゲルは同種であっても異種であってもよく、それらの境界面は明瞭であっても不明瞭であってもよい。

【００２４】

（培養器具）

人為的な細胞パターンを得るための培養器具は、細胞を所定のパターンに配置するための培養表面を有する。培養表面は典型的には細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域を備えており、細胞接着性領域の形状及び配置に沿って細胞または細胞集合体がパターニングされる。細胞接着性領域の材料としては、ポリスチレン、ポリエステル、シリコーン樹脂等の合成高分子、ガラス、金やチタン等の金属、変性ポリアクリルアミド、変性ポリアクリル酸、変性ポリエチレングリコール、変性ポリビニルアルコール等ある程度の細胞接着性が付与された親水性合成高分子等が挙げられる。細胞接着阻害性領域の材料としては、ポリアクリル酸、ポリエチレングリコール、Pluronic（登録商標）類、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、寒天、アルブミン等が挙げられる。細胞接着性領域および細胞接着阻害性領域のより好ましい形態については以下に説明するとおりである。

【００２５】

細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とを備える培養表面の典型的な形態としては２つの形態が挙げられる。第一の形態では、細胞接着性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む細胞接着阻害性の親水性膜に酸化処理および／または分解処理を施して細胞接着性とした膜で形成されており、細胞接着阻害性領域が、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されている。第二の形態では、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とが、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されており、細胞接着性領域における前記有機化合物の密度が、細胞接着阻害性領域における前記有機化合物の密度と比較して低いように構成されている。どちらも好適であるが特に第一の形態が好ましい。

【００２６】
培養器具の特に好ましい形態について以下に詳述する。
【００２７】
（培養器具の基材）
培養器具を構成する基材としては、その表面に炭素酸素結合を有する有機化合物の皮膜を形成することが可能な材料で形成されたものであれば特に限定されるものではない。具体的には、金属、ガラス、セラミック、シリコン等の無機材料、エラストマー、プラスチック（例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ＡＢＳ樹脂、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂）で代表される有機材料を挙げることができる。その形状も限定されず、例えば、平板、平膜、フィルム、多孔質膜等の平坦な形状や、シャーレ、シリンダ、スタンプ、マルチウェルプレート、マイクロ流路等の立体的な形状が挙げられる。培養器具がシャーレ等の容器形状である場合、それ単独で培養を行うことができる。平板のように容器でない形状の場合は、通常の培養容器と組み合わせて用いればよい。細胞培養時の酸素濃度を高める必要がある場合や、図３の構成において個体基材と適当な培養容器との間に、ゲルに包埋された細胞が配置された時に生じる酸素濃度の分布（濃度勾配）を均一化する必要がある場合は、酸素透過性が高い基材を用いるとよい。そのような基材をつくる材料としては、例えばシリコーン樹脂や酸素高透過性ソフトコンタクトレンズに用いられるシリコーンハイドロゲルが挙げられる。
【００２８】
（細胞接着阻害性領域）
細胞接着阻害性領域は、炭素酸素結合を有する有機化合物により形成される親水性膜により形成されることが好ましい。当該親水性膜は、水溶性や水膨潤性を有する、炭素酸素結合を有する有機化合物を主原料とする薄膜であり、酸化される前は細胞接着阻害性を有し、酸化および／または分解された後は細胞接着性を有しているものであれば特に限定されない。
【００２９】
炭素酸素結合とは、炭素と酸素との間に形成される結合を意味し、単結合に限らず二重結合であってもよい。炭素酸素結合としてはＣ－Ｏ結合、Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合、Ｃ＝Ｏ結合が挙げられる。
【００３０】
主原料としては、水溶性高分子、水溶性オリゴマー、水溶性有機化合物、界面活性物質、両親媒性物質等が挙げられ、これらが相互に物理的または化学的に架橋し、基材と物理的または化学的に結合することにより親水性薄膜となる。
【００３１】
具体的な水溶性高分子材料としては、ポリアルキレングリコールおよびその誘導体、ポリアクリル酸およびその誘導体、ポリメタクリル酸およびその誘導体、ポリアクリルアミドおよびその誘導体、ポリビニルアルコールおよびその誘導体、双性イオン型高分子、多糖類、等を挙げることができる。分子形状は、直鎖状、分岐を有するもの、デンドリマー等を挙げることができる。より具体的には、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの共重合体、例えば、Pluronic F108、Pluronic F127、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（Ｎ－ビニル－２－ピロリドン）、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（メタクリロイルオキシエチルフォスフォリルコリン）、メタクリロイルオキシエチルフォスフォリルコリンとアクリルモノマーの共重合体、デキストラン、およびヘパリンが挙げられるがこれらには限定されない。
【００３２】
具体的な水溶性オリゴマー材料や水溶性低分子化合物としては、アルキレングリコールオリゴマーおよびその誘導体、アクリル酸オリゴマーおよびその誘導体、メタクリル酸オリゴマーおよびその誘導体、アクリルアミドオリゴマーおよびその誘導体、酢酸ビニルオ

リゴマーの鹸化物およびその誘導体、双性イオンモノマーからなるオリゴマーおよびその誘導体、アクリル酸およびその誘導体、メタクリル酸およびその誘導体、アクリルアミドおよびその誘導体、双性イオン化合物、水溶性シランカップリング剤、水溶性チオール化合物等を挙げることができる。より具体的には、エチレングリコールオリゴマー、（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）オリゴマー、メタクリロイルオキシエチルフォスフォリルコリンオリゴマー、低分子量デキストラン、低分子量ヘパリン、オリゴエチレングリコールチオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、２－〔メトキシ（ポリエチレンオキシ）－プロピルトリメトキシシラン、およびトリエチレングリコール－ターミネーティッド－チオールが挙げられるがこれらには限定されない。

【００３３】

親水性膜は、処理前は高い細胞接着阻害性を有し、酸化処理および／または分解処理後は弱い細胞接着性を示すものであることが望ましい。

【００３４】

親水性膜の平均厚さは、０．８ｎｍ～５００μｍが好ましく、０．８ｎｍ～１００μｍがより好ましく、１ｎｍ～１０μｍがより好ましく、１．５ｎｍ～１μｍが最も好ましい。平均厚さが０．８ｎｍ以上であれば、タンパク質の吸着や細胞の接着において、基板表面の親水性薄膜で覆われていない領域の影響を受けにくいため好ましい。また、平均厚さが５００μｍ以下であればコーティングが比較的容易である。

【００３５】

基材表面への親水性膜の形成方法としては、基材へ親水性有機化合物を直接吸着させる方法、基材へ親水性有機化合物を直接コーティングする方法、基材へ親水性有機化合物をコーティングした後に架橋処理を施す方法、基材への密着性を高めるために多段階式に親水性薄膜を形成させる方法、基材との密着性を高めるために基材上に下地層を形成し、次いで親水性有機化合物をコーティングする方法、基板表面に重合開始点を形成し、次いで親水性ポリマーブラシを重合する方法等を挙げることができる。

【００３６】

上記成膜方法のうち特に好ましい方法としては、多段階式に親水性薄膜を形成させる方法、並びに、基材との密着性を高めるために基材上に下地層を形成し、次いで親水性有機化合物をコーティングする方法を挙げることができる。これらの方法を用いると、親水性有機化合物の基材へ密着性を高めることが容易だからである。本明細書では「結合層」という用語を用いる。結合層とは、多段階式に親水性有機化合物の薄膜を形成する場合には最表面の親水性薄膜層と基板との間に存在する層を意味し、基材表面に下地層を設け当該下地層の上に親水性薄膜層を形成する場合には当該下地層を意味する。結合層は、結合部分（リンカー）を有する材料を含む層であることが好ましい。リンカーとリンカーに結合させる材料の末端の官能基の組み合わせとしては、エポキシ基と水酸基、フタル酸無水物と水酸基、カルボキシル基とＮ－ハイドロキシスクシイミド、カルボキシル基とカルボジイミド、アミノ基とグルタルアルデヒド等が挙げられる。それぞれの組み合わせにおいて、いずれがリンカーであっても良い。これらの方法においては、親水性材料によるコーティングを行う前に、基板上にリンカーを有する材料により結合層を形成する。結合層における前記材料の密度は結合力を規定する重要な因子である。前記密度は、結合層の表面における水の接触角を指標として簡便に評価することができる。例えば、エポキシ基を末端に有するシランカップリング剤（エポキシシラン）を例にとると、エポキシシランを付加した基板表面の水接触角が典型的には４５°以上、望ましくは４７°以上であれば、次に酸触媒存在下エチレングリコール系材料等を付加することによって十分な細胞接着阻害性を有する基板を作ることができる。

【００３７】

（親水性膜の酸化処理および／または分解処理による細胞接着性領域の形成）

第一の形態では、細胞接着性領域は、炭素酸素結合を有する有機化合物を含む細胞接着阻害性の親水性膜に酸化処理および／または分解処理を施して細胞接着性とした膜により

形成される。こうして形成された細胞接着性領域は細胞を接着する能力が比較的弱いために、当該領域上に接着した細胞または細胞集合体のパターンはゲルのように細胞と相互作用が比較的強い材料に対して高速に転写することが可能である。このような細胞接着性領域は細胞の接着が極めて弱いため、図３の構成にした時に速やかに細胞の極性が変化して、細胞がゲル層と主に接着するようになり、三次元培養と同様の環境を容易に作ることができる。さらに、図３の構成にしてから比較的短時間で固体基材（培養器具）のみを剥離することによって図１の構成の三次元培養系や図２の構成の三次元培養系を構築できる。

【００３８】

本発明において「酸化」とは狭義の意味であり、有機化合物が酸素と反応して酸素の含有量が反応以前よりも多くなる反応を意味する。

【００３９】

本発明において「分解」とは有機化合物の結合が切断されて１種の有機化合物から２種以上の有機化合物が生じる変化を指す。「分解処理」としては典型的には、酸化処理による分解、紫外線照射による分解などが挙げられるがこれらには限定されない。「分解処理」が酸化を伴う分解（つまり酸化分解）である場合、「分解処理」と「酸化処理」とは同一の処理を指す。

【００４０】

紫外線照射による分解とは、有機化合物が紫外線を吸収し、励起状態を経て分解することを指す。なお、有機化合物が、酸素を含む分子種（酸素、水など）とともに存在している系中に紫外線を照射すると、紫外線が化合物に吸収されて分解が起こる以外に、該分子種が活性化して有機化合物と反応する場合がある。後者の反応は「酸化」に分類できる。そして活性化された分子種による酸化により有機化合物が分解する反応は、「紫外線照射による分解」ではなく「酸化による分解」に分類できる。

【００４１】

以上のように「酸化処理」と「分解処理」は操作としては重複する場合があり、両者を明確に区別することはできない。そこで本明細書では「酸化処理および／または分解処理」という用語を使用する。

【００４２】

酸化処理および／または分解処理の方法としては、親水性膜を紫外線照射処理する方法、光触媒処理する方法、酸化剤で処理する方法などが挙げられる。親水性膜は所望の細胞パターンの形状にあわせて部分的に酸化処理および／または分解処理が施される。部分的に酸化処理および／または分解処理する場合は、フォトマスクやステンシルマスク等のマスクを用いたり、スタンプを用いたりするとよい。また、紫外線レーザ等のレーザを用いた方式等の直描方式で酸化処理および／または分解処理を施してもよい。

【００４３】

紫外線照射処理の場合は、波長１８５ｎｍや２５４ｎｍの紫外線を出す水銀ランプや波長１７２ｎｍの紫外線を出すエキシマランプなどのＶＵＶ領域からＵＶ－Ｃ領域の紫外線を出すランプを光源として用いることが好ましい。光触媒処理する場合は、波長３６５ｎｍ以下の紫外線を出す光源を用いることが好ましく、波長２５４ｎｍ以下の紫外線を出す光源を用いることがより好ましい。光触媒としては、酸化チタン光触媒、金属イオンや金属コロイドで活性化された酸化チタン光触媒を用いるのが好ましい。酸化剤としては、有機酸や無機酸を特に制限なく用いることができるが、高濃度の酸は取り扱いが難しいので、１０％以下の濃度に希釈して用いると良い。最適な紫外線処理時間、光触媒処理時間、酸化剤処理時間は、用いる光源の紫外線強度、光触媒の活性、酸化剤の酸化力や濃度などの諸条件に応じて適宜決定することができる。

【００４４】

（親水性膜の低密度化による細胞接着性領域の形成）

第二の形態では細胞接着性領域は、炭素酸素結合を有する有機化合物を低密度で含む親水性膜により形成される。こうして形成された細胞接着性領域もまた細胞を接着する能力が比較的弱いために、当該領域上に接着した細胞または細胞集合体のパターンはゲルのよ

うに細胞と相互作用が比較的強い材料に対して高速に転写することが可能である。このような細胞接着性領域は細胞の接着が極めて弱いため、図３の構成にした時に速やかに細胞の極性が変化して、細胞がゲル層と主に接着するようになり、三次元培養と同様の環境を容易に作ることができる。さらに、図３の構成にしてから比較的短時間で固体基材（培養器具）のみを剥離することによって図１の構成の三次元培養系や図２の構成の三次元培養系を構築できる。

【００４５】

この形態では、細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域とは、ともに炭素酸素結合を有する有機化合物を含む親水性膜で形成されている。２つの領域は前記有機化合物の密度が相違する。同密度が高いほど細胞は接着しにくくなる傾向がある。細胞接着性領域では、前記有機化合物の密度が、細胞が接着できる程度に低い。一方、細胞接着阻害性領域では、前記有機化合物の密度が、細胞が接着できない程度に高い。

【００４６】

親水性有機化合物の密度を制御する方法としては、親水性有機化合物の薄膜と基材表面との間に結合層を設け、当該結合層の親水性有機化合物との結合力を調整する方法が挙げられる。ここで「結合層」とは上記で定義した通りであり、上記で説明した好ましい材料から構成され得る。結合層の結合力は、結合層におけるリンカーを有する材料の密度が高いほど強くなり、同密度が低いほど弱くなる。結合層におけるリンカーを有する材料の密度は、上述の通り、結合層の表面における水の接触角を指標として簡便に評価することができる。

【００４７】

この実施形態では、細胞接着性領域の結合層における、リンカーを有する材料の密度は低い。細胞接着性領域における、親水性有機化合物の薄膜を形成する前の結合層の表面の水接触角は、リンカーを有する材料としてエポキシ基を末端に有するシランカップリング剤（エポキシシラン）を使用する場合を例にとると、典型的には、１０°～４３°、望ましくは１５°～４０°である。このような結合層を形成する方法としては、リンカーを有する材料の被膜（結合層）を基材表面に形成した後、当該結合層の表面を酸化処理および／または分解処理する方法が挙げられる。結合層表面を酸化処理および／または分解処理する方法としては、結合層表面を紫外線照射処理する方法、光触媒処理する方法、酸化剤で処理する方法などが挙げられる。結合層表面は所望の細胞パターンの形状にあわせて部分的に酸化処理および／または分解処理が施される。部分的な処理は、フォトマスクやステンシルマスク等のマスクを用いたり、スタンプを用いることにより行うことができる。また、紫外線レーザ等のレーザを用いた方式等の直描方式で酸化処理および／または分解処理を施してもよい。諸条件などについても、親水性膜の酸化処理および／または分解処理による細胞接着性領域の形成する方法の場合と同様の条件を適用できる。こうして形成された結合層上に親水性有機化合物の薄膜を形成することにより、細胞接着性領域が形成できる。

【００４８】

本発明のこの実施形態では、細胞接着阻害性領域の結合層における、リンカーを有する材料の密度は高い。細胞接着阻害性領域における、親水性有機化合物の薄膜を形成する前の結合層の表面の水接触角は、リンカーを有する材料としてエポキシ基を末端に有するシランカップリング剤（エポキシシラン）を使用する場合を例にとると、典型的には４５°以上、望ましくは４７°以上である。このような結合層は、リンカーを有する材料の被膜を基材表面に形成することにより得られる。結合層表面を部分的に酸化処理および／または分解処理した場合には、処理を受けない残余の部分が前記水接触角を有する結合層となる。こうして形成された結合層上に親水性有機化合物の薄膜を形成することにより、細胞接着阻害性領域が形成できる。

【００４９】

（細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域との比較）

以下の説明は上記の２つの形態のどちらにも適用される。

細胞接着性領域（結合層が存在する場合には結合層も含む）と細胞接着阻害性領域（結合層が存在する場合には結合層も含む）との間の段差は１０ｎｍ以下であることが好ましい。図３の構成の場合の三次元培養において、面方向の細胞の運動が阻害されないからである。細胞接着性領域と細胞接着阻害性領域のいずれが凸部であってもよい。

【００５０】

細胞接着性領域（結合層が存在する場合には結合層も含む）の炭素量は、細胞接着阻害性領域（結合層が存在する場合には結合層も含む）の炭素量と比較して低いことが好ましい。具体的には、細胞接着性領域の炭素量が、細胞接着阻害性領域の炭素量に対して２０～９９％であることが好ましい。この範囲内に該当することは、親水性膜の厚さ（結合層が存在する場合には結合層の厚さと親水性膜の厚さの合計）が１０μｍ以下の場合に特に好適である。「炭素量（atomic concentration、％）」は下記に定義する通りである。

【００５１】

また、細胞接着性領域（結合層が存在する場合には結合層も含む）における炭素のうちで酸素と結合している炭素の割合（％）の値は、細胞接着阻害性領域（結合層が存在する場合には結合層も含む）における炭素のうちで酸素と結合している炭素の割合（％）の値に対して小さい値であることが好ましい。具体的には、細胞接着性領域における炭素のうちで酸素と結合している炭素の割合（％）の値が、細胞接着阻害性領域における炭素のうちで酸素と結合している炭素の割合（％）の値に対して３５～９９％であることが好ましい。この範囲内に該当することは、親水性膜の厚さ（結合層が存在する場合には結合層の厚さと親水性膜の厚さの合計）が１０μｍ以下の場合に特に好適である。「酸素と結合している炭素の割合（atomic concentration、％）」は下記に定義する通りである。

【００５２】

（親水性薄膜の評価方法）

本発明の親水性薄膜（結合層が存在する場合には結合層も含む）の評価手法としては、接触角測定、エリプソメトリー、原子間力顕微鏡観察、電子顕微鏡観察、オージェ電子分光測定、Ｘ線光電子分光測定、各種質量分析法、白色光干渉計、共焦点レーザ顕微鏡、プローブ式レーザ顕微鏡などを用いることができる。これらの手法の中で、最も定量性に優れているのはＸ線光電子分光測定（ＸＰＳ／ＥＳＣＡ）である。この測定方法で求められるのは相対的定量値であり、一般的に元素濃度（atomic concentration、％）で算出される。以下、本発明におけるＸ線光電子分光分析方法を詳細に説明する。

【００５３】

（親水性薄膜の炭素量の算出方法、および酸素と結合している炭素の割合の算出方法）

本発明において親水性薄膜の「炭素量」は、「Ｘ線光電子分光装置を用いて得られるＣ１ｓピークの解析値から求められる炭素量」と定義される。また、本発明において親水性薄膜の「酸素と結合している炭素の割合」は、「Ｘ線光電子分光装置を用いて得られるＣ１ｓピークの解析値から求められる酸素と結合している炭素の割合」と定義される。以下に具体的な測定方法を２つ記載する。なお、本発明は、これらの測定方法に限定されるものではない。

【００５４】

（測定方法１）

Ｘ線光電子分光装置：サーモエレクトロン社製のVG_Theta Probe。

Ｘ線源：単色化アルミニウムＫα線（15kV-6.67mA=100W）。

測定面積：400μｍφ

試料と検出器の位置関係：試料法線から53°の位置に光電子取り込みレンズが存在。

炭素量：基材や親水性薄膜を構成する元素を想定し、測定する光電子のセットを決める。測定したトータルの光電子を１００％とした時の各光電子由来の元素濃度（atomic concentration）を算出する。Ｃ１ｓピークの元素濃度（atomic concentration ％）を炭素量とする。

Ｃ１ｓピークのフィッティング方法：Ｃ－Ｏ結合、Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合、Ｃ＝Ｏ結合、Ｃ－Ｃ結合でフィッティングする。

酸素と結合している炭素の割合の算出式：{〔Ｃ－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ＝Ｏ結合の炭素の割合〕}÷{〔Ｃ－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ＝Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ－Ｃ結合の炭素の割合〕＋〔（必要の場合）その他の結合の炭素の割合〕}×１００（％）。

なお、必要の場合は、その他の結合も加えてフィッティングする。このデータを基にＣ１ｓピークの各結合状態の炭素の濃度（atomic concentration ％）を算出する。

【００５５】

（測定方法２）

Ｘ線光電子分光装置：KRATOS Analytical社製のESCA-3400 (Amicus)。

Ｘ線源：非単色化マグネシウムＫα線（10kV-20mA＝200W）。

測定面積：6mmφ

試料と検出器の位置関係：試料法線上に光電子取り込みレンズが存在。

炭素量：基材や親水性薄膜を構成する元素を想定し、測定する光電子のセットを決める。測定したトータルの光電子を１００％とした時の各光電子由来の元素濃度（atomic concentration）を算出する。Ｃ１ｓピークの元素濃度（atomic concentration ％）を炭素量とする。

Ｃ１ｓピークのフィッティング方法：Ｃ－Ｏ結合、Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合、Ｃ＝Ｏ結合、Ｃ－Ｃ結合でフィッティングする。

酸素と結合している炭素の割合の算出式：{〔Ｃ－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ＝Ｏ結合の炭素の割合〕}÷{〔Ｃ－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ＝Ｏ結合の炭素の割合〕＋〔Ｃ－Ｃ結合の炭素の割合〕＋〔（必要の場合）その他の結合の炭素の割合〕}×１００（％）。

なお、必要の場合は、その他の結合も加えてフィッティングする。このデータを基にＣ１ｓピークの各結合状態の炭素の濃度（atomic concentration ％）を算出する。

【００５６】

（生物学的試験法）

本発明の生物学的試験法では、上記の手順で調製された、実質的にゲルに包埋された細胞パターンにおける細胞の増殖、運動及び分化からなる群から選択される少なくとも１つに関連する生物学的指標を試験する。

具体的には、細胞パターンの周囲に存在するゲルや培地中に試験の目的に応じて薬剤や細胞を含ませた状態で細胞の増殖、運動及び分化からなる群から選択される少なくとも１つに関連する生物学的指標を試験する。図４のように複数の細胞パターンを組み合わせて、複数の細胞についての生物学的指標を一度に試験することもできる。また、図５のように複数の細胞パターンを接触させることにより、細胞の複合体についての生物学的指標を試験することもできる。試験中、細胞パターンおよびゲルは細胞が増殖、運動または分化可能な温度条件に保持されることが好ましい。ゲルや培地中には必要に応じて細胞の増殖、運動または分化に適した溶媒、緩衝液等を含ませる。

【００５７】

「細胞の増殖、運動及び分化からなる群から選択される少なくとも１つに関連する生物学的指標」としては、遺伝子総量、細胞周期、細胞数、生細胞と死細胞の割合、任意の時間あたりの個々の細胞の運動距離や運動の方向、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、ギャップジャンクションなどの細胞－細胞間結合の変動、細胞の種類や分化状態に応じた各種分化マーカーの発現亢進や抑制などを挙げることができる。

【００５８】

本発明によれば、このような生物学的指標に基づいて種々の試験を行うことができる。試験としては特に限定されないが、例えば、細胞毒性試験や化学遊走試験、タンパク質リン酸化阻害剤の試験、Ｇタンパク質シグナル・セカンドメッセンジャー阻害剤の試験、カルモジュリンリン酸化タンパク質阻害剤の試験、サイクリン依存性タンパク質リン酸化阻害剤の試験、ＭＡＰリン酸化関連阻害剤の試験、チロシンリン酸化阻害剤の試験、Wntシグナル関連阻害剤の試験、Aktリン酸化シグナル阻害剤の試験、Notchシグナル阻害剤の試

験、タンパク質脱リン酸化阻害剤の試験、サイトカインシグナル阻害剤の試験、ホルモン阻害剤の試験、ＨＤＡＣ阻害剤の試験、ＮＦκB阻害剤の試験、核－細胞質間の物質輸送阻害剤の試験、カルシウムシグナルなどの神経系関連阻害剤の試験、タンパク質分解酵素の阻害剤の試験、細胞外マトリックス分解酵素の阻害剤の試験、酸化ストレス関連の阻害剤の試験、アポトーシスの誘導剤や阻害剤の試験、血管新生の誘導剤や阻害剤の試験、細胞骨格の阻害剤の試験、細胞分裂の阻害剤の試験、テロメラーゼ阻害剤の試験、糖化の阻害剤の試験、ＤＮＡ合成阻害剤の試験、その他制癌剤など薬剤の試験が挙げられる。

【００５９】

本発明による生物学的試験法において実施される細胞培養の方法は特に限定されない。例えば、ディッシュやマルチウェルプレートなどを用いた通常の閉鎖培養やバイオリアクターなどを用いた灌流培養が用いられる。

【００６０】

（細胞運動の観察）

細胞の運動の観察のためには、例えば運動を動画撮影し、動画の画像解析を行うことが好ましい。

【００６１】

（動画撮影方法）

動画撮影方法の典型的な例について記載する。顕微鏡下において温度３７℃、CO_2濃度５％で観察・記録が可能な撮影装置を用いる。動画撮影の際の適切な撮影時間間隔は細胞によって異なるが、細胞の運動方向が大きく変化してしまわない程度の間隔であれば問題ない。例えば、牛の血管内皮膚細胞のガラス上における運動の場合、適当な時間間隔は１～５分程度である。

【００６２】

（動画解析方法）

撮影した動画に対して細胞の重心あるいは細胞核を細胞の位置としその位置座標の時間変化を各細胞について記録する。数値化できるパラメータとして速度ベクトルあるいはその集団平均、速度の時空間相関関数、平均自乗変移あるいはその時間依存性を表すパラメータ、細胞集団を囲む面積などがある。また細胞が楕円状になっているなど向きが特定できる場合には配向の時空間相関関数もパラメータとして数値化可能である。速度ベクトルは各時間間隔において細胞が移動した変移ベクトルをその時間で割れば得られ、また集団平均することにより細胞集団全体としての運動の様子を知ることができる。速度の時空間相関関数は速度ベクトル間の角度の余弦の平均として得られ、特定の細胞に対してある時間により平均したものが時間相関関数、時間を固定してある細胞間距離について平均したものが空間相関関数となる。時空間相関関数は０から１の間の値を取り、値が大きいほど速度ベクトル間の相関が強く運動方向が揃っている。平均自乗変移はある時間を初期値としそこからある時間後の細胞の移動距離の自乗を細胞集団について平均したものであり、細胞集団の拡散の様子についての情報が得られる。平均自乗変移の時間依存性が時間のα乗であるとするとフィッティングによりパラメータαを求めることができる。各細胞がランダムな運動である場合はαが１であり２に近づくほど弾道的な運動である。細胞集団を囲む面積Ｓは、細胞集団の重心から個々の細胞までの距離の自乗の平均値に対応する。細胞の配向の時空間相関関数は速度の時空間相関関数と同じ計算法で得られ、細胞の向きの方向ベクトルを速度ベクトルに置き変えれば良く、相関関数の値が大きいほど配向性が高い。解析には適当な画像解析ソフトウェアを用いれば便利であり、フリーの画像解析ソフトウェアとしてはimageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij)やscion image(http://www.scioncorp.com)などがある。

【００６３】

（生物学的試験用キット）

本発明はまた、上述の培養器具とゲルとを含むことを特徴とする、生物学的試験用キットを提供する。本発明のキットには必要に応じて細胞培養のための緩衝液や、細胞培養のための容器（例えばマルチウェルプレート）や、試験のための薬剤や、取扱説明書などが

含まれていてもよい。キット中のゲルは、使用時に水などの溶媒や緩衝液を加えることでゲル化できる固体（粉末も含む）の形態であってもよい。

【００６４】

本キットのひとつの使用例は、市販のマルチウェルプレート、ゲル、試験物質など必要なものを用意し、哺乳類の種の異なる特定臓器のある種の細胞を上述の培養器具を用いて哺乳類の種別にパターン培養し、上述のマルチウェルプレートの異なるウェルの中で同時に本発明の三次元培養試験をすることにより、種差についての作用の違いを試験する場合である。

【実施例】

【００６５】

（実施例１）

（細胞培養用基板の作製）

（一段階目の反応）

トルエン３９．０ｇ、ＴＳＬ８３５０（ＧＥ東芝シリコーン製）２．２５ｇを混合し、攪拌しながらトリエチルアミンを４５０μｌ添加した。そのまま室温で数分間攪拌した後、全量をガラス皿へ移した。ここにＵＶ洗浄済みの１０ｃｍ角のガラス基板を浸漬し、室温で１６時間放置した。その後、ガラス基板をエタノールと水で洗浄し、窒素ブローで乾燥させた。基板表面の水接触角はおよそ５３°であった。

【００６６】

（二段階目の反応）

５０ｇのテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）を攪拌しながら２５μｌの濃硫酸を一滴ずつ添加した。そのまま数分間攪拌してから、全量をガラス皿に移した。ここに上記の基板を浸漬し、８０℃で２０分間反応させた。反応後、基板をよく水洗し、窒素ブローで乾燥させた。これにより、ガラス基板表面にＴＥＧを含む有機薄膜が形成された。表面の水接触角はおよそ２８°であった。

【００６７】

（酸化処理）

酸化チタン系光触媒を塗布したフォトマスクを作製した。フォトマスクは、幅６０μｍの開口部が３００μｍピッチで形成されたラインパターンに、２．５ｃｍ間隔で左記ラインパターンと直交する幅６０μｍのライン状の開口部からなっているものを用いた。フォトマスクの光触媒層と上記の成膜面を接触させ、フォトマスク側から紫外線が照射されるよう露光機内に設置した。波長３６５ｎｍの照度が２０ｍＷ／ｃｍ^{2}の水銀ランプで３５秒間露光し、基板表面の親水性薄膜を部分的に酸化分解した。この基板を２５ｍｍ×１５ｍｍの大きさに切断し、細胞接着基板として使用した。

【００６８】

（細胞培養）

オートクレーブ滅菌した基板を培養容器内に配置し、５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を適量添加した。ここに、基板一枚あたり２．０×１０^{5}個のウシ大動脈血管内皮細胞を播種した。インキュベーター内（３７℃、５％CO_2）で４８時間培養したところ、細胞は酸化分解領域にのみ接着し、幅６０μｍのライン上でコンフルエントになっていた。

【００６９】

（細胞転写と図２の構成の三次元培養）

コラーゲンゲル培養キット（Ｃｅｌｌｍａｔｒｉｘ　Ｉ－Ａ、新田ゼラチン）を用いて氷上でコラーゲン溶液を調製した。このうち５００μｌを２８ｍｍ×３３ｍｍのウェルに平坦に広げ、３７℃で１０分間ゲル化させた。ここに、５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を２ｍｌ添加した。基板に接着した細胞とコラーゲンゲルが底の方で接触するように基板を逆さまにして培地に沈めた。インキュベータ内で４時間培養した後、ピンセットで注意深く基板を除去したところ、ほぼすべての細胞がコラーゲンゲル上でチューブ様構造をとっていた。培地を吸引除去し、上記のコラーゲン溶液２５０μｌを細胞の上に重層し、３７℃で１０分間ゲル化させた。その後、増殖因子（１０ｎｇ/ｍｌ血管内皮細胞増殖因子

、１０ｎｇ/ｍｌ塩基性繊維芽細胞増殖因子、５０μｇ/ｍｌヘパリン）を添加した５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を２ｍｌ加え、図２の構成の三次元培養を行った。培養２４時間後、既存のチューブ様構造から新たな血管が伸びる現象が観察された。これは、細胞間接着を維持しながら増殖・遊走することを特徴とする血管新生と呼ばれる現象であり、集団的細胞遊走の代表例である。その後も血管新生は継続的に起こり、培養一週間後には極めて分岐の多い毛細血管様のネットワークが高密度に形成された。一方、本三次元培養系にあらかじめ血管新生阻害剤の一種であるスラミン（５０μＭ）を添加しておくと、この血管新生は完全に阻害された。

【００７０】

（実施例２）

（一段階目の反応）

トルエン３９．０ｇ、ＴＳＬ８３５０（ＧＥ東芝シリコーン製）１．２０ｇを混合し、攪拌しながらトリエチルアミンを４５０μｌ添加した。そのまま室温で数分間攪拌した後、全量をガラス皿へ移した。ここにＵＶ洗浄済みの１０ｃｍ角のガラス基板を浸漬し、室温で１６時間放置した。その後、ガラス基板をエタノールと水で洗浄し、窒素ブローで乾燥させた。基板表面の水接触角はおよそ５１°であった。

【００７１】

（二段階目の反応）

５０ｇのＴＥＧを攪拌しながら２５μｌの濃硫酸を一滴ずつ添加した。そのまま数分間攪拌してから、全量をガラス皿に移した。ここに上記の基板を浸漬し、８０℃で２０分間反応させた。反応後、基板をよく水洗し、窒素ブローで乾燥させた。これにより、ガラス基板表面にＴＥＧを含む有機薄膜が形成された。表面の水接触角はおよそ２８°であった。

【００７２】

（酸化処理）

酸化チタン系光触媒を塗布したフォトマスクを作製した。フォトマスクは、幅６０μｍの開口部が３００μｍピッチで形成されたラインパターンに、２．５ｃｍ間隔で左記ラインパターンと直交する幅６０μｍのライン状の開口部からなっているものを用いた。フォトマスクの光触媒層と上記の成膜面を接触させ、フォトマスク側から紫外線が照射されるよう露光機内に設置した。波長３６５ｎｍの照度が２０ｍＷ／ｃｍ^{2}の水銀ランプで３５秒間露光し、基板表面の親水性薄膜を部分的に酸化分解した。この基板を２５ｍｍ×１５ｍｍの大きさに切断し、細胞接着基板として使用した。

【００７３】

（細胞培養）

オートクレーブ滅菌した基板を培養容器内に配置し、５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を適量添加した。ここに、基板一枚あたり２．０×１０^{5}個のウシ大動脈血管内皮細胞を播種した。７２時間後、細胞は酸化分解領域にのみ接着し、幅６０μｍのライン上でコンフルエントになっていた。

【００７４】

（細胞転写と図３の構成の三次元培養）

氷冷した成長因子低減マトリゲル（ベクトン・ディッキンソン）２００μｌを培養容器上に広げ、室温で約１分間放置した後、上記の基板を細胞接着面を下にしてマトリゲルの上に静かに置いた。この状態で約５分間放置し、完全にゲル化させた後、５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を加えて基板を浸漬させた。培養容器をインキュベーター（３７℃、５％CO_2）の中に移し、基板とマトリゲルに挟まれた状態で細胞培養を行った。３時間後、基板上に接着していた細胞集団が著しく収縮し、円柱状の塊になっていた。これは、細胞外マトリックスから分化シグナルを受けた血管内皮細胞が管腔を形成する際に特徴的に見られる現象である。本三次元培養系に血管新生阻害剤をあらかじめ添加しておくと、その薬理作用に応じて多細胞収縮が阻害されたりされなかったりした（表１）。このことは、分化の初期段階に見られる細胞収縮を観察することによって管腔形成に対する薬剤の効

果を効率的に試験できることを意味している。本試験法は正常ヒト臍帯静脈内皮細胞においてもまったく同様に実施可能であった。

【００７５】

【表１】

本試験法における種々の薬剤の管腔形成阻害効果

阻害剤	作用機序	阻害効果
Suranim	増殖因子とその受容体の結合を阻害	×
BT	細胞増殖やMMPの活性を阻害	△
Amiloride	u-PAの活性を阻害	×
Minocycline	MMP3の活性を阻害	×
Anti-VE-cadherin antibody	細胞間接着を阻害	×
RGD peptide	フィブロネクチンとの結合を阻害	×
YIGSR-NH_2 peptide	ラミニンとの結合を阻害	△
PP2	チロシンキナーゼSrcの活性を阻害	○
LY294002	PI3キナーゼの活性を阻害	△
Akt inhibitor	Aktキナーゼの活性を阻害	×
Y27632	Rhoキナーゼの活性を阻害	×

○･･･阻害効果大 △･･･阻害効果小 ×･･･阻害効果なし

【００７６】

（実施例３）

（一段階目の反応）

トルエン３９．０ｇ、ＴＳＬ８３５０（ＧＥ東芝シリコーン製）０．５６ｇを混合し、攪拌しながらトリエチルアミンを４５０μｌ添加した。そのまま室温で数分間攪拌した後、全量をガラス皿へ移した。ここにＵＶ洗浄済みの１０ｃｍ角のガラス基板を浸漬し、室温で１６時間放置した。その後、ガラス基板をエタノールと水で洗浄し、窒素ブローで乾燥させた。基板表面の水接触角はおよそ５０°であった。

【００７７】

（二段階目の反応）

５０ｇのＴＥＧを攪拌しながら２５μｌの濃硫酸を一滴ずつ添加した。そのまま数分間攪拌してから、全量をガラス皿に移した。ここに上記の基板を浸漬し、８０℃で２時間反応させた。反応後、基板をよく水洗し、窒素ブローで乾燥させた。これにより、ガラス基板表面にＴＥＧを含む有機薄膜が形成された。基板表面の水接触角はおよそ２７°であった。

【００７８】

（酸化処理）

酸化チタン系光触媒を塗布したフォトマスクを作製した。フォトマスクは、幅６０μｍの開口部が３００μｍピッチで形成されたラインパターンに、２．５ｃｍ間隔で左記ラインパターンと直交する幅６０μｍのライン状の開口部からなっているものを用いた。フォトマスクの光触媒層と上記の成膜面を接触させ、フォトマスク側から紫外線が照射されるよう露光機内に設置した。波長３６５ｎｍの照度が２０ｍＷ／ｃｍ^{2}の水銀ランプで３５秒間露光し、基板表面の親水性薄膜を部分的に酸化分解した。この基板を２５ｍｍ×１５ｍｍの大きさに切断し、細胞接着基板として使用した。

【００７９】

（細胞培養）

オートクレーブ滅菌した基板を培養容器内に配置し、５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を適量添加した。ここに、基板一枚あたり２．０×１０^{5}個のウシ大動脈血管内皮細胞を播種した。７２時間後、細胞は酸化分解領域にのみ接着し、幅６０μｍのライン上でコンフルエントになっていた。

【００８０】
（細胞転写と図３の構成の三次元培養）
氷冷した成長因子低減マトリゲル（ベクトン・ディッキンソン）２００μｌを培養容器上に広げ、室温で約１分間放置した後、上記の基板を細胞接着面を下にしてマトリゲルの上に静かに置いた。この状態で約５分間ゲル化させた後、５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を加えて基板を浸漬させた。培養容器をインキュベーター（３７℃、５％CO_2）の中に移し、基板とマトリゲルに挟まれた状態で細胞培養を行った。３時間後に位相差顕微鏡で細胞を観察したところ、基板上に接着していた細胞集団が著しく収縮し、円柱状の塊になっていた。このとき細胞間の境界が極めて不明瞭であったことから判断すると、マトリゲルの重層によって細胞間接着が高度に発達していたと思われる。ところが、そのまま培養を続けると、分化の初期段階にあった細胞集団は24時間以内に脱分化を起こし、細胞間接着の崩壊および単細胞遊走が観察された。この三次元培養系は、血管内皮細胞の分化・脱分化のスイッチングおよび細胞間接着の発達と崩壊を試験するのに有用な培養系であると考えられる。
【００８１】
（実施例４）
（細胞培養用基板の作製）
（一段目の反応）
トルエン３９ｇ、エポキシシラン（ＴＳＬ８３５０、ＧＥ東芝シリコーン）１３．５ｇ、トリエチルアミン４５０μｌを混合し溶液を調整した。この溶液を所定量ガラスシャーレ内に移し、１０ｃｍ角で厚さ０．７ｍｍの紫外線洗浄済みのガラスを浸漬し、室温で１６時間反応させた後に、ガラス板をエタノールで洗浄し、次いで水で超音波洗浄し、乾燥した。ガラス板表面の水接触角は、平均５０．１°であった。
【００８２】
（二段目の反応）
テトラエチレングリコール５０ｇに濃硫酸２５μｌを攪拌しながら加えた。この溶液を所定量ガラスシャーレに移し、上記のエポキシ化ガラス板を浸漬し、８０℃で２０分間反応させた。反応後の基板を水洗、乾燥し、表面水接触角を測定したところ、平均２９．４°であった。
【００８３】
（酸化処理）
酸化チタン系光触媒を塗布したフォトマスクを作製した。フォトマスクは、幅６０μｍの開口部が３００μｍピッチで形成されたラインパターンに２．５ｃｍ間隔で左記ラインパターンに直交する幅６０μｍのライン状の開口部が形成され、且つ、周囲に幅約１．５ｃｍの開口部を有するものを用いた。あらかじめ露光機の照度を３５０ｎｍの波長で計測し、露光時間の設定の目安とした。照度は１８．６ｍＷ／ｃｍ^{2}であった。親水性薄膜が形成されたガラス基板と上記フォトマスクを、親水性薄膜とフォトマスクの触媒層が対向するように配置し、フォトマスク側から光が照射されるよう露光機内に設置した。５７秒間露光し、酸化処理を行った。その後、培養に使いやすいように、２４ｍｍ×１５ｍｍの大きさに切断した。
【００８４】
（細胞培養）
上記のように切断した基板をオートクレーブで高圧水蒸気滅菌した。この基板を培養容器に配置し、基板一枚あたり１．５×10^5個のウシ由来頚動脈血管内皮細胞（ＢＡＥＣ）を播種した。５％血清を含むＭＥＭ培地を用いて、３７℃、５％CO_2濃度のインキュベータ内で４８時間培養した。蛍光位相差顕微鏡で観察したところ、ＢＡＥＣは酸化処理された部分にのみ接着していた。
【００８５】
（細胞転写と三次元培養）
マトリゲル（商標）を培養容器の上に２００μｌ展開し、室温で数分間保持してある程

度ゲル化させた。このマトリゲル（商標）内に、あらかじめＰＫＨ２６で蛍光標識させたマウス由来線維芽細胞を５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ注入し、上記の細胞培養基板をマトリゲル（商標）と対向するようにして載せた。次いで１０％血清を含むＤ－ＭＥＭ培地を加えインキュベータ内で、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で３時間培養した。この時点で、ＢＡＥＣはチューブ状に形態変化を起こしていることを蛍光位相差顕微鏡で確認した。また、線維芽細胞はマトリゲル内でほとんど遊走していないことを蛍光位相差顕微鏡で確認した。ピンセットを用いて注意深く基板を剥離し、ＢＡＥＣをマトリゲル（商標）上に転写し、さらにインキュベーターで３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で２時間培養した。この時点で、ＢＡＥＣ、線維芽細胞ともにほとんど遊走していないことを蛍光位相差顕微鏡で確認した。

【００８６】

（実施例５）

（細胞培養用基板の作製）

（一段目の反応）

トルエン３９ｇ、エポキシシラン（ＴＳＬ８３５０、ＧＥ東芝シリコーン）０．７ｇ、トリエチルアミン４００μｌを混ぜて溶液を調製した。この溶液を所定量容器に移し、１０ｃｍ角で厚さ０．７ｍｍの紫外線洗浄済みガラス板を浸漬した。室温で１８時間反応させた後に、ガラス板をトルエンで洗浄し、次いでエタノールで洗浄し、最後に水で超音波洗浄した。ガラス板表面の水接触角は、平均５１．３°であった。

【００８７】

（二段目の反応）

テトラエチレングリコール５０ｇに濃硫酸２５μｌを攪拌しながら加えた。この溶液を所定量容器に移し、上記のエポキシ化ガラス板を浸漬し、８０℃で２０分間反応させた。反応後、よく水洗した。ガラス板表面の水接触角は、平均３２．０°であった。これにより、親水性薄膜が形成されたガラス板を作製できた。

【００８８】

（酸化処理）

酸化チタン系光触媒を塗布したフォトマスクを作製した。フォトマスクには、１００μｍ角でピッチ２００μｍの遮光部アレイの領域と、２００μｍ角でピッチ４００μｍの遮光部アレイの領域と、３００μｍ角でピッチ６００μｍの遮光部アレイの領域と、４００μｍ角でピッチ８００μｍの遮光部アレイの領域が形成されており、フォトマスクの周囲に幅１．５ｃｍの開口部が形成されている。あらかじめ露光機の照度を３５０ｎｍの波長で計測し、露光時間の設定の目安とした。照度は１８．６ｍＷ／ｃｍ^{2}であった。親水性薄膜が形成されたガラス板と上記フォトマスクの光触媒層が対向するように配置し、石英板の裏側から紫外線が照射されるよう露光機内に設置した。１６１秒間露光し、酸化処理を行った。その後、培養に使うために２４ｍｍ×１５ｍｍの大きさに切断した。また、フォトマスクの周囲の開口部と対向していた部分はＸ線光電子分光分析に用いた。

【００８９】

（表面分析）

サーモエレクトロン社製のVG_Theta Probeを用いて酸化処理前の親水性薄膜、酸化処理後の親水性薄膜を測定した。Ｃ１ｓピークを－Ｃ結合の炭素、－Ｏ結合の炭素、Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ結合とＣ＝Ｏ結合の炭素でフィッティングした酸化処理後の親水性薄膜の炭素量は、酸化処理前の親水性薄膜の炭素量の８５．３％であった。また、酸化処理前の親水性薄膜における酸素と結合している炭素の割合は７６．７％であり、酸化処理後の親水性薄膜における酸素と結合している炭素の割合は、６４．６％であった。また、酸化処理後の親水性薄膜表面の水接触角は、２８．８°であった。さらに、走査型白色干渉計（Zygo NewView 5000）を用いてパターニング表面を観察したところ、約１ｎｍの段差がマスクパターンに応じて形成されていた。

【００９０】

（細胞培養）

上記の切断済みのパターン培養用基板（２００μｍ角の細胞接着領域がピッチ４００μ

mで形成されている）をオートクレーブで高圧水蒸気滅菌した。この基板を培養容器に配置し、培養液（基礎培地Ｍ－１０６－５００Ｓ、添加剤ＫＥ－６３５０、Cascade Biologics／クラボウ）に分散した正常ヒト成人皮膚繊維芽細胞（ＫＦ－４１０９、Cascade Biologics）を基板一枚あたり2×10^5個の割合で播種した。インキュベータを用いて３７℃、５％CO_2の条件下で４６時間培養した。単層の繊維芽細胞からなる細胞パッチアレイが形成された。パッチ中心部の細胞は、比較的小さくなっているのに対し、パッチ周縁部の細胞は比較的紡錘形であった。

【００９１】

（細胞転写と図２の構成の三次元培養）

コラーゲンゲルキット（Ｃｅｌｌｍａｔｒｉｘ　Ｉ－Ａ、新田ゼラチン）を用いてメーカーのプロトコルに従い試薬を調製し、培養容器の上に上記の細胞培養基板１枚あたり２５０μｌずつ試薬を展開し、室温で１０分間保持してある程度ゲル化させた。このコラーゲンゲル上に、上記の細胞培養基板を細胞パッチアレイがコラーゲンゲルと対向するようにして、コラーゲンゲル上に載せた。この状態で３７℃のインキュベータ内にて３分間静置し、次いで上記の培地を加えインキュベータ内で４時間培養した。この時点では、細胞パッチの細胞は、ほとんど遊走していなかった。その後、ピンセットを用いて注意深く基板を剥離し、細胞パッチアレイをコラーゲンゲル上に転写した。次いで培地を吸引除去し、上記のコラーゲン試薬を基板一枚あたり２５０μｌずつ加え、インキュベータ内で３０分間静置してコラーゲンをゲル化させた。その後、培地を加えて図２の構成の三次元培養を行った。位相差顕微鏡で観察したところ、培養４時間後には、細胞パッチの周囲の細胞が遊走を始めていた。１４時間後には、さらに細胞の遊走が進んでいたがパッチ中心部の細胞は、ほとんど動いていなかった。４０時間後には、細胞の遊走がさらに進み増殖もして細胞パッチ間が連結しているような状態になった。また、パッチ中央部の細胞が、三次元培養の当初よりも紡錘形に近い状態になった。また、培地に１０μＭのジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を加えて同様の三次元培養を行った場合とＤＭＳＯなしの実験と比較したところ、細胞の運動性の経時的変化に有意な差はなかった。これらの結果から、これらの実験をコントロール実験として、各種阻害剤の効果を試験することが可能であることが示された。

【００９２】

（実施例６）

（細胞培養）

実施例５で作製した３００μｍ角の細胞接着性領域が６００μｍピッチで形成されているパターン培養用基板を用いた。実施例５と同じ細胞と培地を用い、基板一枚あたり4×10^5個の正常ヒト成人皮膚繊維芽細胞（ＮＨＤＦ）を播種し、適量の培地を加えてインキュベータで培養した。２３時間後に位相差顕微鏡で観察したところ、細胞スフェロイドアレイが形成されていた。また、基板一枚あたり1.8×10^5個のＮＨＤＦを播種して細胞パッチアレイを作製した。

【００９３】

（細胞集合体のゲルへの包埋）

上記の細胞スフェロイドアレイおよび細胞パッチアレイを実施例５で用いたコラーゲンゲルキットから作製したゲルに包埋し図１の三次元培養を行った。細胞の運動と増殖を経時観察した。本実験では、細胞スフェロイドアレイは、最初パターン培養基板に接着していた領域の細胞から遊走を始めた。その単位時間あたりの細胞遊走距離は、細胞パッチアレイのパッチ周囲の細胞の単位時間あたりの遊走距離と有意な差がなかった。一方、スフェロイド本体は少なくとも培養開始から１５時間程度は遊走が認められなかった。培養開始から４０時間後には、スフェロイド本体の密度が疎になるとともにスフェロイド本体からの細胞の浸潤が認められた。

【００９４】

（実施例７）

（細胞培養用基板の作製）

（一段目の反応）
トルエン３９ｇ、エポキシシラン（ＴＳＬ８３５０、ＧＥ東芝シリコーン）１３．５ｇ、トリエチルアミン４５０μｌを混合し溶液を調整した。この溶液を所定量ガラスシャーレ内に移し、直径３１ｍｍで厚さ約０．１ｍｍの紫外線洗浄済みのガラスを浸漬し、室温で１８時間反応させた後に、ガラス板をエタノールで洗浄し、次いで水で超音波洗浄し、乾燥した。ガラス板表面の水接触角は、平均５１．１°であった。
【００９５】
（二段目の反応）
テトラエチレングリコール５０ｇに濃硫酸２５μｌを攪拌しながら加えた。この溶液を所定量ガラスシャーレに移し、上記のエポキシ化ガラス板を浸漬し、８０℃で２０分間反応させた。反応後の基板を水洗、乾燥し、表面水接触角を測定したところ、平均３０．２°であった。
【００９６】
（酸化処理とパターニングボトムディッシュの作製）
実施例４と同じ条件で１８０秒間露光し、酸化処理を行いパターニングガラスを得た。このガラスを直径２７ｍｍのホールがあいた３５ｍｍポリスチレンディッシュの裏面に貼り付けた。
【００９７】
（細胞培養）
上記ディッシュを７０％エタノールで滅菌した。培養液（基礎培地Ｍ－１０６－５００Ｓ、添加剤ＫＥ－６３５０、Cascade Biologics／クラボウ）に分散した正常ヒト成人皮膚繊維芽細胞（ＫＦ－４１０９、Cascade Biologics）をディッシュ一個あたり4×10^5個の割合で播種した。インキュベータを用いて３７℃、５％CO_2の条件下で１８時間培養した。接着細胞からなるライン状パターンを得た。
【００９８】
（細胞集合体のゲルへの包埋）
実施例５で用いたコラーゲンゲルキットから作製したゲルに包埋し図３の三次元培養を行った。３７℃で３０分間ゲル化させた後に、（１）上記の培養液をいれた系、（２）上記の培養液に阻害剤ＰＰ２を１０μＭ加えた培養液をいれた系、（３）上記で調製したＰＰ２入り培養液に含まれるＤＭＳＯ（ＰＰ２の１ｍＭストック溶液を作るときの溶媒として使用）と同濃度のＤＭＳＯを含む培養液の系の３種の培養を行った。培養開始から３時間後、６時間後、９時間後、２１時間後の細胞の遊走や増殖の状態を観察した。その結果、（１）と（３）の系と比べて（２）の阻害剤を含む系では有意に細胞の遊走ならびに増殖が抑えられた。
【００９９】
（実施例８）
（細胞培養）
実施例５で用いた切断済みのパターン培養用基板（２００μｍ角の細胞接着領域がピッチ４００μｍで形成されている）をオートクレーブで高圧水蒸気滅菌した。この基板を培養容器に配置し、５％ウシ胎児血清入りＭＥＭ培地を用いてＢＡＥＣをパターン培養した。１８時間パターン培養した基板と、細胞－細胞間接着をさらに発達させた４２時間パターン培養した基板を用いて以下の三次元培養をおこなった。
【０１００】
（細胞集合体へのゲルへの包埋）
成長因子低減マトリゲル（ベクトン・ディッキンソン）を用いて実施例２と同様の図３の三次元培養を行い、タイムラプス観察を行った。その結果、細胞運動のランダム性および細胞の運動速度の平均値は、１８時間パターン培養の系と４２時間パターン培養の系で有意差はなかった。一方、細胞集団を囲む面積Ｓの単位時間当たりの増加量には有意な差があった。すなわち４２時間パターン培養の系の面積Ｓの単位時間当たりの増加量は、１８時間パターン培養の系のそれの１／５であった。このことは、血管内皮細胞の細胞－細

胞間接着の強さ、細胞集合体の収縮力、血管内皮細胞の分化／脱分化が複合的に影響していると考えられた。

【図面の簡単な説明】

【０１０１】

【図１】図１には、ゲル層（１）中に大部分が包埋され、一部が露出した状態の細胞パターン（２）からなる試験系の断面図を示す。

【図２】図２には、２つのゲル層（１）（３）の間に配置され、全体がゲルに包埋された細胞パターン（２）からなる試験系の断面図を示す。

【図３】図３には、固体基材（４）に一部が接触し、残部がゲル層（１）に包埋された細胞パターン（２）からなる試験系の断面図を示す。

【図４】図４には、２つのゲル層（５）（７）の間に配置され、全体がゲルに包埋された細胞パターン（６）と、ゲル層（７）（９）の間に配置され、全体がゲルに包埋された細胞パターン（８）とが積層配置された試験系の断面図を示す。

【図５】図５には、ゲル層（１０）中に大部分が包埋された細胞パターン（１１）と、ゲル層（１３）中に大部分が包埋された細胞パターン（１２）とが接触するように対向配置された試験系の断面図を示す。

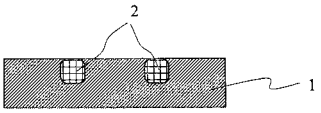
【図６】図６には、細胞パターン（１４）と、当該細胞パターンに対する影響を試験したい物質（１５）とがゲル層（１６）中に位置決めして配置された試験系の平面図を示す。

【符号の説明】

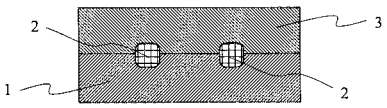
【０１０２】

１，３，５，７，９，１０，１３，１６・・・ゲル層
２，６，８，１１，１２，１４・・・細胞パターン
４・・・固体基材（培養器具）
１５・・試験したい物質
Ｌ・・細胞パターン（１４）と試験したい物質（１５）との距離

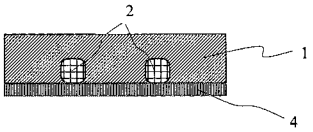
【図１】



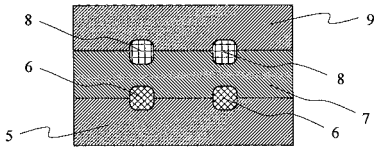
【図２】



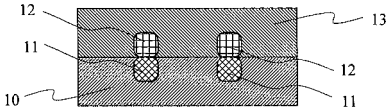
【図３】



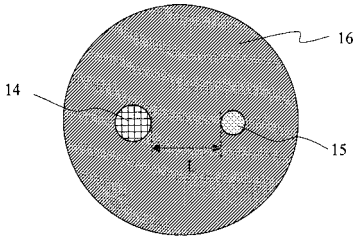
【図４】



【図５】



【図６】



フロントページの続き

(72)発明者　大河内　則彦
東京都新宿区市谷加賀町一丁目１番１号　大日本印刷株式会社内
(72)発明者　黒田　正敏
東京都新宿区市谷加賀町一丁目１番１号　大日本印刷株式会社内
(72)発明者　長谷　雅彦
東京都新宿区市谷加賀町一丁目１番１号　大日本印刷株式会社内

Ｆターム(参考) 4B063 QA05　QQ08　QR77　QS36　QX01　QX02